



## Bibliographic data: JP 10287554 (A)

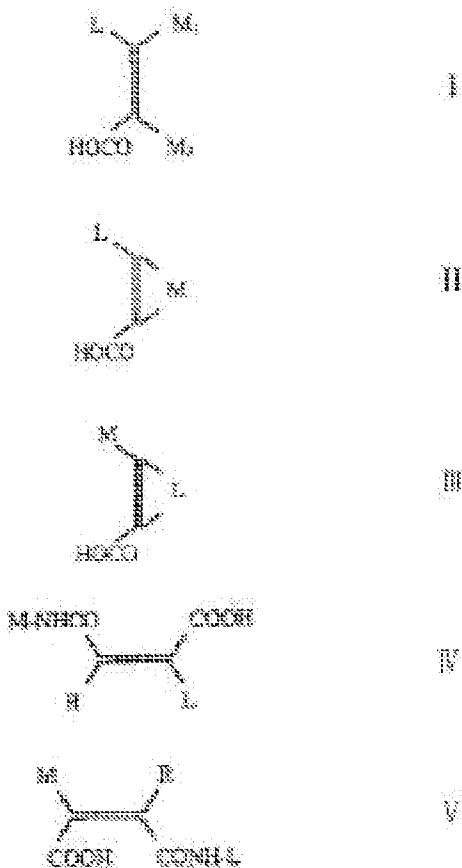
### FUNCTIONAL LIPOSOME

**Publication date:** 1998-10-27  
**Inventor(s):** KASUYA YUJI; OKADA JUNICHI +  
**Applicant(s):** SANKYO CO +  
**Classification:** - international: A61K47/48; A61K9/127; (IPC1-7): A61K47/48; A61K9/127  
- European:  
**Application number:** JP19970098608 19970416  
**Priority number(s):** JP19970098608 19970416

### Abstract of JP 10287554 (A)

**PROBLEM TO BE SOLVED.** To obtain a functional liposome wherein a modifying agent is released with time under mild conditions without depending on the difference of an environment and wherein the hydrophilicity or hydrophobicity of the surface is changed in response to the release of the modifying agent, by modifying a liposome with the modifying agent comprising a water-soluble polymer.

**SOLUTION:** This modified liposome is obtained by binding a liposome to a modifying agent comprising a water-soluble polymer through a covalent bond capable of being gradually broken under mild conditions. The bond between the liposome and the modifying agent is preferably a carbon-nitrogen double bond. A bond expressed by formula I (L is the liposome; M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> are each a linear or branched modifying agent), formula II (M is the modifying agent), formula III, formula IV, formula V, etc., is preferable. The modifying agent is especially preferably a linear polyethylene glycol.



Last updated:  
26.04.2011 Worldwide  
Database 5.7.23.1; 92p

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) **公開特許公報 (A)**

(11)特許出願公開番号

**特開平10-287554**

(43)公開日 平成10年(1998)10月27日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

A 61 K 9/127  
47/48

識別記号

F I

A 61 K 9/127  
47/48

A  
Z

審査請求 未請求 請求項の数 6 O.L. (全 13 頁)

(21)出願番号 特願平9-98608

(22)出願日 平成9年(1997)4月16日

(71)出願人 000001856

三共株式会社

東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号

(72)発明者 柏谷 裕司

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株  
式会社内

(72)発明者 岡田 純一

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株  
式会社内

(74)代理人 弁理士 大野 彰夫 (外2名)

(54)【発明の名称】 機能性リポソーム

(57)【要約】

【課題】環境の相違に依存せず、経時的に性質が変化するリポソームを提供する。

【解決手段】水溶性高分子から成る修飾剤が経時的に離脱することを特徴とする修飾リポソームに関する。

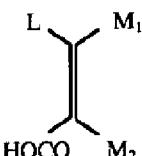
【特許請求の範囲】

【請求項 1】水溶性高分子からなる修飾剤が経時的に離脱することを特徴とする修飾リポソーム。

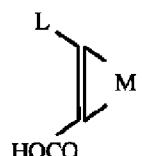
【請求項 2】リポソームと修飾剤との結合が炭素原子と窒素原子との二重結合であることを特徴とする請求項 1 に記載の修飾リポソーム。

【請求項 3】リポソームと修飾剤との結合が [式 1] 乃至 [式 11] のいずれか一つで表される請求項 1 に記載の修飾リポソーム。

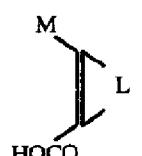
【化 1】



[1]

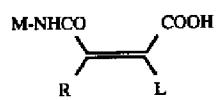


[2]

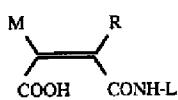


[3]

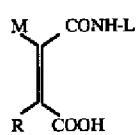
【化 2】



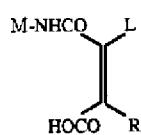
[4]



[5]

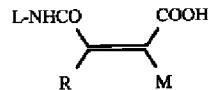


[6]

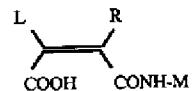


[7]

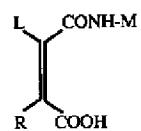
【化 3】



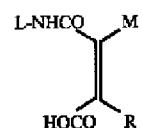
[8]



[9]



[10]



[11]

( [式 1] 乃至 [式 11] において、L はリポソームを表し、M は直鎖状または分枝状の修飾剤を表し、M<sub>1</sub>およびM<sub>2</sub>は同種または異種の直鎖状または分枝状の修飾剤を表す。)

【請求項 4】修飾剤が以下の群から選択されるいづれか一つであり、直鎖状または分枝状であることを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれか一つに記載の修飾リポソーム：ポリメチレングリコール、ポリエチレングリコール、ポリn-プロピレングリコール、ポリiso-プロピレングリコール、ポリヒドロキシプロピレングリコール。

【請求項 5】修飾剤が直鎖状または分枝状のポリエチレングリコールである請求項 1 乃至 4 のいずれか一つに記載の修飾リポソーム。

【請求項 6】修飾剤が直鎖状のポリエチレングリコールである請求項 1 乃至 5 のいずれか一つに記載の修飾リポソーム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、経時的に修飾剤が離脱し、それに対応して表面の親疎水性が変化する新規な機能性リポソームに関する。

【0002】

【従来の技術】リポソームは脂質の二重膜からなる小胞体で、機能性微粒子として広く応用されている。医薬分野においては、リポソーム内への薬物の封入によって該薬物の体内動態を変化させることにより治療効果の向上が図られている。

【0003】しかし、リポソームには病態組織に対する特異性がなく食食細胞などが存在する細網内皮組織 (reticuloendothelial system : 以下「RES」という。) に非特異的に食食されやすい。これを回避するため、粒子径を制御し、ポリエチレングリコール (polyethyleneglycol : 以下「PEG」とする。) 等の水溶性高

分子で被覆することにより RES を回避する手段が開発されている ( Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 11460-11464, (1991) / Cancer Res. 52, 2431-2439, (1992) 参照)。

【0004】しかし、上記の修飾に基づきリポソームが RES を回避するとの性質を得た場合、他方においてリポソームと生体成分との相互作用が低下することが知られている ( Stealth Liposomes (CRC Press, D. Lasic, F. Martin 編) pp. 119-125, (1995) 参照)。これにより、病態組織における細胞によるリポソームの取り込みの効率が低下しその結果該リポソームに封入された薬物の細胞内への送達の効率が低下したり、酵素などの生体成分との相互作用により引き起こされるリポソームの崩壊が抑制されその結果該リポソームに封入された薬物の放出速度が低下するとの弊害があった。

【0005】これらの問題点を解決するため、各種の環境応答性リポソーム、すなわち、疾病に起因する環境変化、または、正常組織と患部の環境の相違に応答して性質が変化するリポソームが検討されている ( Cancer Res., 40, 1388-1395, (1980) / Strahlentherapie, 160, 732-740, (1980) / FEBS Letter, 388, 115-118, (1996) 等参照)。原理的には、このような環境応答性リポソームにより、循環時には安定な構造を維持しながら RES を回避し、病態組織に移行した後または病態組織を通過する際には迅速な薬物放出及び/または細胞移行性が得られることになる。しかし、実際には、これらの環境の相違がこのようなリポソームの性質を変化させるのに不十分であるか、または、より敏感に環境に応答するリポソームについては使用前の保存安定性の確保が困難である等の理由により、このような環境応答性リポソームは現在まで実用化に至っていない。さらに、疾病由来の環境相違には個体差があり、環境応答性にばらつきが生じやすいことも実用化を困難にしている。

#### 【0006】

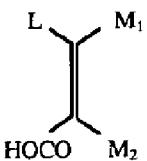
【発明が解決しようとする課題】このように、従来の環境応答性リポソームには実用化を困難にする問題点が多く、このようなリポソームとは異なる新しい様式のリポソームが求められている。本発明者らは、環境の相違に依存せず、緩和な条件下で徐々に切断され得る共有結合を介して水溶性高分子で修飾され、経時的に性質を変化させるリポソームを製造し、本発明を完成した。

#### 【0007】

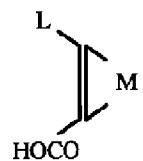
【課題を解決するための手段】本発明は、(1) 水溶性高分子からなる修飾剤が経時に離脱することを特徴とする修飾リポソーム、(2) リポソームと修飾剤との結合が炭素原子と窒素原子との二重結合であることを特徴とする(1)に記載の修飾リポソーム、(3) リポソームと修飾剤との結合が下記の【式1】乃至【式11】のいずれか一つで表される請求項1に記載の修飾リポソーム：

#### 【0008】

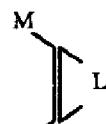
##### 【化4】



[1]



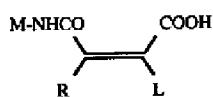
[2]



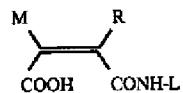
[3]

#### 【0009】

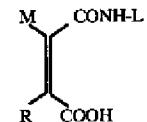
##### 【化5】



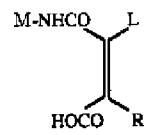
[4]



[5]



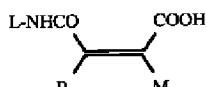
[6]



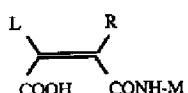
[7]

#### 【0010】

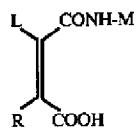
##### 【化6】



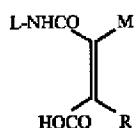
[8]



[9]



[10]



[11]

【0011】（[式1]乃至[式11]において、Lはリポソームを表し、Mは直鎖状または分枝状の修飾剤を表し、M<sub>1</sub>およびM<sub>2</sub>は同種または異種の直鎖状または分枝状の修飾剤を表す。）

（4）修飾剤が以下の群から選択されるいづれか一つであり、直鎖状または分枝状であることを特徴とする

（1）乃至（3）のいづれか一つに記載の修飾リポソーム：ポリメチレングリコール、ポリエチレングリコール、ポリn-プロピレングリコール、ポリiso-プロピレングリコール、ポリヒドロキシプロピレングリコール、

（5）修飾剤が直鎖状または分枝状のポリエチレングリコールである（1）乃至（4）のいづれか一つに記載の修飾リポソーム、（6）修飾剤が直鎖状のポリエチレングリコールである（1）乃至（5）のいづれか一つに記載の修飾リポソーム、に関する。

【0012】本発明において修飾剤とは、以下のa乃至kのいづれか一つの群から選択されるもの等を意味する：

- a) ビニル系高分子、
- b) アクリル系高分子、
- c) a乃至bの群から選択されるポリマーを構成するモノマー2種以上を構成単位とする共重合体、
- d) a乃至bの群から選択されるポリマーを構成するモノマーを少なくとも一つの構成単位とし、次の群から少なくとも1つ選択されるモノマーを他の構成単位とする水溶性の共重合体：スチレン、クロロメチルスチレン、ブロモメチルスチレン、酢酸ビニル、メチルメタクリレート、ブチルアクリレート、メチルシアノアクリレート、エチルシアノアクリレート、n-プロピルシアノアクリレート、iso-プロピルシアノアクリレート、n-ブチルシアノアクリレート、iso-ブチルシアノアクリレート、tert-ブチルシアノアクリレート、エチルビニルエーテル、n-ブロピルビニルエーテル、iso-ブロピルビニル

- エーテルn-ブチルビニルエーテル、iso-ブチルビニルエーテル、tert-ブチルビニルエーテル等、
- e) ポリアルキレングリコール、
- f) ポリヒドロキシプロピレングリコール、
- g) ポリエチレンイミン、
- h) ポリアミノ酸、
- i) 水溶性のポリペプチド、
- j) 多糖類、

k) a乃至jの群のいづれかに記載の高分子を構成単位とする水溶性のブロック共重合体またはグラフト共重合体。

【0013】ここでビニル系高分子とは、ポリビニルアルコール、ポリメチルビニルエーテル、ポリビニルピロリドン、ポリビニルオキサゾリドン、ポリビニルメチルオキサゾリドン、ポリビニルアミン、ポリ2-ビニルピリジン、ポリ4-ビニルピリジン、ポリN-ビニルサクシニミド、ポリN-ビニルホルムアミド、ポリN-ビニル-N-メチルホルムアミド、ポリN-ビニルアセトアミド、ポリN-ビニル-N-メチルアセトアミド、ポリマレイン酸、ポリフマル酸、ポリイタコン酸、ポリイタコン酸モノメチルエステル、ポリクロトン酸、ポリケイ皮酸、ポリスチレンスルホン酸等を意味し、アクリル系高分子とは、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリ2-ヒドロキシエチルメタクリレート、ポリ2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、ポリN,N-ジメチルアミノエチルアクリレート、ポリN,N-ジメチルアミノエチルメタクリレート、ポリN,N-ジエチルアミノエチルアクリレート、ポリN,N-ジエチルアミノエチルメタクリレート、ポリN-tert-ブチルアミノエチルアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリN,N-ジメチルアクリルアミド、ポリN-イソプロピルアクリルアミド、ポリジアセトンアクリルアミド、ポリメチロールアクリルアミド、ポリアクリロイルモルホリン、ポリアクリロイルピロリジン、ポリアクリロイルピペリジン、ポリ2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸等を意味し、ポリアルキレングリコールとは、ポリメチレングリコール、ポリエチレングリコール、ポリn-プロピレングリコール、ポリiso-プロピレングリコール等を意味し、ポリアミノ酸とは、一種のアミノ酸がペプチド結合を介して複数個連結しているポリマーを意味し、好適には、ポリグルタミン酸、ポリリジン等を意味し、水溶性のポリペプチドとは、複数種のアミノ酸がペプチド結合を介して複数個連結しているポリマーを意味し、多糖類とは、デキストラン、デキストラン硫酸、アミノエチルデキストラン硫酸、セルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、アミロペクチン、アミロース、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、カーデラン硫酸、ポリソルビトール、アルギン酸、ペクチン、ペクチン酸、キサンタン、ジェラン、プルラン等を意味す

る。

【0014】また、これらの高分子の官能基の一部が他の官能基に変換されていてもよい。例えば、ポリエチレングリコールの末端の水酸基はメトキシ化されていてもよい。

【0015】本発明の修飾リポソームは、緩和な条件下において徐々に切断し得る共有結合を介して、リポソーム及び修飾剤が結合している。

【0016】この性質を満たす共有結合の例として、次の二つを挙げることができる：

(a) 炭素原子と窒素原子との二重結合（以下、この結合を「シップ塩基」という。）、(b) アミノ基とマレイン酸類のカルボキシル基との間に形成されるアミド結合（以下、このアミド結合を「マレイル基を介したアミド結合」という。）。

【0017】該共有結合がシップ塩基の場合、シップ塩基を構成する炭素原子及び窒素原子は、リポソーム表面と修飾剤のどちらの側に存在していてもよい。すなわち、シップ塩基によって結合した修飾剤とリポソームの位置関係は、下記の【式12】及び【式13】のいずれでもよい。

【0018】

【化7】

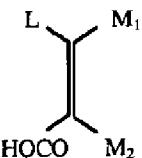


【0019】（【式12】及び【式13】において、 $R_1$ は $-CH_2-$ 基を表し、 $R_2$ は、 $-CH_2-$ 、 $-NHC(=O)-$ 、及び $-NH-C(=O)H-$ から選択されるいずれか一つを表し、 $R_3$ は、 $-CH_2-$ 、 $-CONH-$ 、及び $-CH_2-NH-$ から選択されるいずれか一つのを表し、 $m$ 及び $n$ は、それぞれ0または1を表す。）。

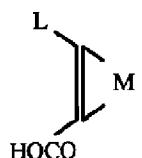
【0020】また、該共有結合がマレイル基を介したアミド結合の場合、修飾剤とリポソームはマレイル基の二重結合に対して互いに反対側に位置する必要があるが、リポソーム及び修飾剤の結合位置についてそれ以外の限界は受けない。すなわち、マレイル基を介したアミド結合によって結合したリポソームと修飾剤の位置関係は、下記の【式1】乃至【式11】のいずれでもよい。

【0021】

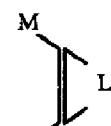
【化8】



【1】



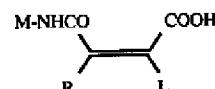
【2】



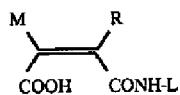
【3】

【0022】

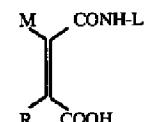
【化9】



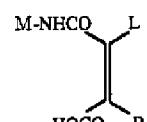
【4】



【5】



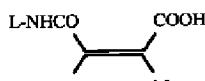
【6】



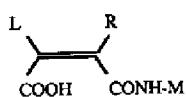
【7】

【0023】

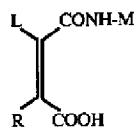
【化10】



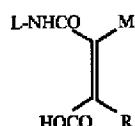
[8]



[9]



[10]



[11]

【0024】（[式1]乃至[式11]において、Lはリポソームを表し、Mは直鎖状又は分枝状の修飾剤を表し、M<sub>1</sub>及びM<sub>2</sub>は同種または異種の直鎖状または分枝状の修飾剤を表す。）

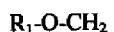
【0025】

【発明の実施の形態】リポソームの製造法は、(I) リポソーム膜の構成成分となり得る化合物（以下、このような化合物を「アンカー」という。）を構成成分のひとつとなるように出発材料として用いリポソームを製造し、その後に修飾剤を一定条件下で化学結合させる方法（特表平4-501117号参照）、(II) 上記のアンカーと修飾剤とを化学結合させた複合体を予め製造し、これを構成成分のひとつとなる様に出発材料として用いリポソームを製造する方法（Biochim. Biophys. Acta. 1113, 171-1992, (1992)参照）、(III) 予め製造したリポソームに上記の複合体を一定条件下で添加する方法（Biochim. Biophys. Acta. 1113, 171-1992, (1992)参照）、のように分類される。

【0026】アンカーとしては、炭素数11ないし30のアルキル基を有する化合物、または、下記の[式14]によって表されるリン脂質が用いられてきた。本発明では、これらを基本骨格とし、アミノ基、ヒドラジド基、ヒドラジノ基、アルデヒド基及び無水のマレイル基から選択される官能基を有する化合物をアンカーとして使用する。

【0027】

【化11】

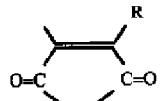


[14]

【0028】（式中、R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>はそれぞれ炭素数12乃至31のアシル基を表し、R<sub>3</sub>はアミノ基、ヒドラジド基、ヒドラジノ基、アルデヒド基及び下記の[式15]によって表される無水のマレイル基から選択される官能基を表し、nは0乃至2の整数を表す：

【0029】

【化12】



[15]

【0030】（式中、Rは炭素数4以下のアルキル基または水素原子を表す。）。

これらの化合物は購入することができる。または、これらの化合物は当業者に周知の有機化合物の合成法（例えば、S. H. Pine, Organic Chemistry fifth edition (McGraw-Hill International Editions) (1987) /バイオ・高分子研究会（編）/バイオ・高分子機能デザインと高分子化学（学会出版センター）(1989) 参照）に従い合成することができる。

【0031】たとえば、アルキルアミンおよびアルキルヒドラジンはアルキル基の炭素数が等しい直鎖状または分枝状のハロアルカンとそれアソニアおよびヒドラジンによる求核置換反応により、アルキルヒドラジドはアルキル基の炭素数が等しい直鎖状または分枝状の脂肪酸とヒドラジンとの脱水縮合により、アルキルアルデヒドはアルキル基の炭素数が等しい直鎖状または分枝状のアルコールの酸化により、それぞれ製造することができる（上記文献参照）。

【0032】無水マレイル基を有するアンカーは、特公平8-2545339号記載の方法に従い、アルキル基の炭素数が等しい直鎖状または分枝状のアルコールを用い、無水マレイン酸のプロモ化およびプロモ化無水マレイン酸のアルカリシスを順次行うことにより、製造することができる。

【0033】リポソームを構成する他の成分としては、各種のリン脂質類、コレステロールなどが挙げられる（参照：野島ら（編）リポソーム（南江堂）、pp. 1-40 (1988) 参照）。

【0034】リポソームの修飾剤としては、従来から、ポリエチレングリコールやプルランなどの各種の水溶性高分子が用いられている（W095/06058号参照）。本発明においても、次のa乃至kの群に示す水溶性高分子を利

用することができる。

【0035】a)ビニル系高分子、

b)アクリル系高分子、

c)a 乃至 b の群から選択されるポリマーを構成するモノマー 2 種以上を構成単位とする共重合体、

d)a 乃至 b の群から選択されるポリマーを構成するモノマーを少なくとも一つの構成単位とし、次の群から少なくとも 1 つ選択されるモノマーを他の構成単位とする水溶性の共重合体、

e)ポリアルキレングリコール、

f)ポリヒドロキシプロピレングリコール、

g)ポリエチレンイミン、

h)ポリアミノ酸、

i)水溶性のポリペプチド、

j)多糖類、

k)a 乃至 j の群のいずれかに記載の高分子を構成単位とする水溶性のブロック共重合体またはグラフト共重合体。

【0036】本発明においては、これらの水溶性高分子にアルデヒド基、アミノ基、ヒドラジド基、およびヒドラジノ基、無水マレイル基の群から選択される官能基を導入しリボソームの修飾に使用することができる。高分子への官能基の導入は当業者周知の化合物合成法にしたがって行うことができる（高分子学会（編）、高分子実験学 6、高分子反応（共立出版）（1978）／新高分子実験学 4、高分子の合成・反応（3）、高分子の反応と分解（共立出版）（1996）参照）。

【0037】従って、もともと上記の官能基が修飾剤に存在しない場合でも各々の修飾剤が有する他の官能基を上記の官能基に変換し使用することができる。このような官能基の変換法としては、例えば以下の方法が挙げられる：

（イ）ポリビニルアルコール、ポリアルキレングリコール、および多糖類は水酸基を有する。また、ポリビニルアルキルエーテルには、分子内のエーテル結合の部分加酸分解（アシドリシス）により水酸基を導入することができる。

【0038】これらの水酸基は、ハロゲン化チオニルで処理することによりハロゲン化され、さらにアンモニアおよびヒドラジンで処理すればそれぞれアミノ基およびヒドラジノ基が導入される。また、酸化により水酸基はアルデヒド基またはカルボキシル基に変換される。さらに、このカルボキシル基にヒドラジンを脱水縮合させればヒドラジド基が導入される。

【0039】（ロ）ポリマレイン酸、ポリフマル酸、ポリイタコン酸、ポリイタコン酸モノメチルエステル、ポリクロトン酸、ポリ桂皮酸、ポリアミノ酸、ポリペプチド、および多糖類の一部（カルボキシメチルセルロース、ヒアルロン酸、アルギン酸、ペクチン酸など）はカルボキシル基を有する。また、ポリN-ビニルピロリド

ン、ポリN-ビニルメチルピロリドン、ポリN-ビニルオキサゾリドン、ポリN-ビニルメチルオキサゾリドン、およびアクリル系高分子には、分子内のエステル結合またはアミド結合の部分加水分解によりカルボキシル基が導入される。

【0040】（ハ）ポリビニルアミンおよびポリエチレンイミンはアミノ基を有する。また、ポリN-ビニルホルムアミド、ポリN-ビニル-N-メチルホルムアミド、ポリN-ビニルアセトアミド、およびポリN-ビニル-N-メチルアセトアミドには、分子内のアミド結合を部分加水分解することによりアミノ基が導入される。さらにアミノ基に無水コハク酸を結合させることによりカルボキシル基が導入される。

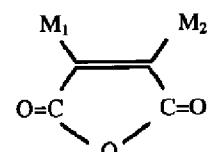
【0041】（ニ）多糖類には、酸化によりカルボキシル基が導入される。

【0042】（ロ）乃至（ニ）におけるカルボキシル基にエチレンジアミンおよびヒドラジンを脱水縮合させればそれぞれアミノ基およびヒドラジド基が導入される。また、カルボキシル基を還元して水酸基に変換すれば、上記と同様にしてアルデヒド基、ヒドラジノ基が導入される。

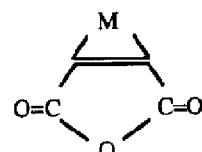
【0043】（ホ）【式13】乃至【式15】に示される無水マレイル基を有する修飾剤は、特公平8-2545339号記載の方法に従い、アルキル基の炭素数が等しい直鎖状または分枝状のアルコールを用い、無水マレイン酸のプロモ化およびプロモ化無水マレイン酸のアルコリシスを順次行うことにより、製造することができる。

【0044】

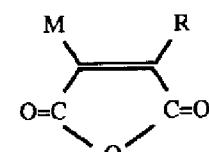
【化13】



【16】



【17】



【18】

【0045】〔〔式16〕乃至〔式18〕において、Mは修飾剤を表し、M<sub>1</sub>およびM<sub>2</sub>は同種のまたは異なる修飾剤を表す。また、Rは炭素数4以下のアルキル基または水素原子を表す。〕すでに述べたように、修飾リポソームの製造方法には、(I) アンカーを構成成分の一つとなるように出発材料として用いリポソームを製造しその後に修飾剤を化学結合させる方法、(II) アンカーと修飾剤を化学結合させた複合体を予め製造しこれを構成成分の一つとなるように出発材料として用いリポソームを製造する方法、および、(III) 予め製造したリポソームの分散液に上記の複合体を添加する方法、という3種の方法がある。

【0046】ここで、(I) および(II)の方法で修飾リポソームを製造する場合には、アンカーと修飾剤との複合体を予め製造する必要がある。

【0047】アンカーと修飾剤との複合体は、ポリエチレングリコールとリン脂質との複合体 (D. Lasic と F. Martin (編)、Stealth Liposomes (CRC Press)、pp. 9 3-102 (1995) 参照)、及び多糖類とステアリン酸との複合体 (U. Haemmerling と O. Westphal、Eur. J. Biochem. 1、46-50 (1967) 参照) の製造例にみられるように、当業者周知の有機合成法 (S. H. Pine、Organic Chemistry fifth edition (McGraw-Hill International Editions) (1987) 参照) に従って製造することができる。

【0048】上記の複合体を予め製造し、これを構成成分の一つとなるように出発材料として用いる修飾リポソームの製造は、ポリエチレングリコールとリン脂質との複合体を構成成分とした修飾リポソーム (T. M. Allen ら、Biochim. Biophys. Acta 1066、29-36 (1991) 参照) の製造例にみられるように当業者周知の通常のリポソームの製造法に従って行うことができる。

【0049】リポソームの製造法としては、薄膜法、逆相蒸発法、など、適用可能な脂質濃度、サイズ、ラメラ数、内水相容積など種々の観点から特徴づけられる種々の製造方法が挙げられる (野島ら (編)、リポソーム (南江堂)、pp. 1-40 (1988) 参照)。本発明においては、これら製造法のうちいずれをも選択でき、上記の複合体を他のリポソーム構成成分と混合して使用することができる。

【0050】予め製造したリポソームの分散液に修飾剤とアンカーの複合体を添加すると、該複合体分子内のアンカーが高い疎水性を有するため、疎水性相互作用により該複合体がリポソーム膜中に包埋され、結果として修飾リポソームが得られる (M. Takada、J. Sunamoto ら、Biophys. Acta 802、237-244 (1984) 参照)。本発明においても、この現象に基づき上記の複合体を使用して修飾リポソームを得ることができる。

【0051】アンカーを構成成分の一つとするリポソームに修飾剤を化学結合させることによる修飾リポソームの製造は、ジパルミトイロスファチジルエタノールア

ミンを構成成分の一つとするリポソームに対し、該アミノ基に対して反応性を有するポリエチレングリコールを結合させたフィッシャーの方法 (参照: 特表平4-501117) に従い、修飾剤をリポソームの分散液に添加し振とうすることによって行うことができる。

【0052】リポソームのサイズの調節法には、超音波照射、エクストルージョン、フレンチプレス法、ホモジナイズ法などが挙げられる (参照: 野島ら (編)、リポソーム (南江堂)、pp. 1-40 (1988))。本発明においても、これらのうちのいずれのサイズ調節法も適用することができる。

### 【0053】

【実施例】以下実施例により本発明をさらに詳細に説明する。ただし、これらは本発明を限定するものではない。

### 【0054】実施例1. ステアリン酸ヒドラジドリポソームの調製

ジパルミトイロスファチジルコリン (以下DPPCとする。) 96mg (約132  $\mu$  mol)、コレステロール (以下Cholとする。) 45mg (約132  $\mu$  mol)、ステアリン酸ヒドラジド (以下SHzとする。) 14.3mg (約132  $\mu$  mol) をナス型フラスコに入れ、クロロホルム5ml を加えて溶解した。これをロータリーエバポレータにセットし、100r pmの回転速度で50mmHgの圧力下クロロホルムを留去し、ナス型フラスコ内壁に脂質の薄膜を形成させた。この薄膜をデシケータ内で1 時間減圧乾燥した後、pH5 のリン酸クエン酸緩衝生理食塩水液 (11.1mMリン酸水素二ナトリウム、2.37mMクエン酸、および135mM 塩化ナトリウムを含有する緩衝液。以下同様とする。) を加えて全量を3ml とし、ボルテックスミキサーにて振とうし、総脂質濃度100mM の多重層リポソームの分散液を得た。このリポソームを以下、SHzリポソームという。

### 【0055】実施例2. ポリエチレングリコール修飾ステアリン酸ヒドラジドリポソームの調製方法

孔径1  $\mu$ m のポリカーボネート製メンブランフィルタを装着したエクストルーダ (Liposofast-Basic、アベスチン (AVESTIN) 社製) を用いて、多重層SHz リポソームについて該メンブランフィルタを通過させた (以下、所定サイズの孔径のポリカーボネート製メンブランフィルタを装着したエクストルーダを用いたリポソームのメンブランフィルタの通過を、「所定サイズのエクストルージョン」という。)。

【0056】このリポソーム分散液500  $\mu$ L に、末端にアルデヒド基を有するポリエチレングリコール ((株)川原油化製。以下「PEG-ALD」という。) 45mgを加え25°Cで24時間振とうし、PEG-ALDで修飾した。得られたポリエチレングリコール修飾リポソームを以下、「PEG-SHz リポソーム」という。PEG-ALDとしては、ポリエチレングリコール部分の分子量が約5000で片末端にアルデヒド基を有するものとポリエチレングリコール部分の分子

量が約3400で両末端にアルデヒド基を有するもの（以下、それぞれ「PEG5000-CHO」および「PEG3400-(CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>」という。）の2種類を使用した。

#### 【0057】試験例1. リポソームのポリエチレングリコール修飾度の評価方法

リポソームの修飾度は、ポリエチレングリコールとデキストランとからなる二相系へのリポソームの分配率に基づき評価した（特表平4-501117号参照）。この二相系においては、ポリエチレングリコール相への分配率が高いほどリポソーム表面の親水性が高く、ポリエチレングリコール修飾度が高いと判断される。

【0058】操作法および分配率の算出法は次の通りである。5w/v% のPEG6000 と5w/v% のデキストランT-500（ファルマシア社）を含む150mM 塩化ナトリウム水溶液4 mL に、脂質濃度100mM のリポソーム分散液100 μL を加えて混和した。

【0059】はじめに、分離前に該混和液 500 μL を採取し、150mM 塩化ナトリウム水溶液で6 倍希釈した後、波長550nm における系の平均濁度を測定した。残りの試料（約3.5mL）は室温で30分間静置することにより二層（上層がポリエチレングリコール相、下層がデキストラン相）に分離させた。この二相系から上層および下層それぞれ500 μL を採取し、150mM 塩化ナトリウム水溶液で6 倍希釈した後各相の濁度を分離前の試料と同様に測定した（分離前、上層および下層各試料の濁度をそ

ジパルミトイルホスファチジルコリン	(60-x) μ mol
(ただし、x は0 乃至10の値を示す。)	
PEG2000-DSPE	x μ mol
コレステロール	40 μ mol

150mM 塩化ナトリウム水溶液で1mL とした。

【0062】PEG2000-DSPEの導入率は、バイオラッド社のプロテインアッセイキットを用い、T. M. Allen らBioc him. Biophys. Acta 1066, 29-36 (1991) 記載の方法に準じて次のように決定した。

【0063】まず、所定の各濃度（0 乃至5mg/mL）のPEG2000-DSPEの150mM 塩化ナトリウム水溶液それぞれ500 μL に、蒸留水で5 倍希釈したプロテインアッセイ液 5 mLを加え、混和して30分間静置後、595nm の吸光度を測定し検量線を作成した。次に、超遠心分離機（Centrikon T-2070型、コントロン・インストラメント（Kontron Instruments）社製）を用い、上記で調製したリポソームの分散液1ml を超遠心分離（150000G ×30min）した。この上清画分500 μL に、蒸留水で5 倍希釈したプロテインアッセイ液5 mLを加え、混和して30分間静置後、595nm の吸光度を測定した。この吸光度および作成した検量線を用いてPEG2000-DSPE濃度を算出した。リポソームに対するPEG2000-DSPEの導入率は、次式より算出した。

【0064】(PEG2000-DSPEの導入率) (%) = (1 -

れぞれa、b およびc とする。)。分離後の上層および下層の体積比はそれぞれ2.8 : 1.2 であったことを考慮し、上層および下層への分配率をそれぞれ次の計算式により求めた。さらに、これらの値から下層に対する上層の分配比（以下、略して分配比とする。）を求めた。

#### 【0060】

上層への分配率=b / a × 2.8 / (2.8+1.2)

下層への分配率=c / a × 1.2 / (2.8+1.2)

分配比=(上層への分配率) / (下層への分配率)

ポリエチレングリコール修飾度と分配比との関係を調べるために、様々な修飾度の修飾リポソームの分配比を調べた。ここで使用したポリエチレングリコールとアンカーが安定に結合したジステアロイル-N-（モノメトキシポリエチレングリコールサクシニル）ホスファチジルエタノールアミン（ポリエチレングリコール部分の分子量約2000、（株）川原油化製、以下「PEG2000-DSPE」という。）をジパルミトイルホスファチジルコリンなどの他のリポソーム構成成分と混合することにより製造した。製造法は多重層SHz リポソームと同様であり、1000nmのエクストルージョンによりサイズの調節を行った。リポソーム構成成分の組成および用いた150mM 塩化ナトリウム水溶液の量は以下の表1の通りである：

#### 【0061】

##### 【表1】

ジパルミトイルホスファチジルコリン	(60-x) μ mol
(ただし、x は0 乃至10の値を示す。)	
PEG2000-DSPE	x μ mol
コレステロール	40 μ mol

（上清画分のPEG2000-DSPE量） / (製造時のPEG2000-DSPE量) × 100

その結果、図1に示すように、PEG2000-DSPE製造時の量が総脂質量に対して5mol% 以下の場合には、90% 以上の割合でリポソームに付加されることがわかった。また、これらのポリエチレングリコール修飾リポソームにおける調製時のPEG2000-DSPEの量とPEG-デキストラン二相系における分配比との関係を図2に示す。この結果、ポリエチレングリコール修飾量と分配比の対数との間に直線関係が成立することが判明した。

#### 【0065】実施例3. ステアリン酸ヒドラジドリポソームのポリエチレングリコール修飾の条件検討

試験例1に記載の修飾後のリポソームの分配比を指標にして、SHz リポソームに対するPEG-ALD 修飾の条件検討を行った。修飾リポソームの分配比に対する時間および温度の影響を調べた結果をそれぞれ図3および図4に示す。反応時間を20時間に固定し温度変化の影響を調べた場合、25°C 乃至40°C においていずれのリポソームも高い分配比を示した（図3）。また、反応温度を40°C に固定

し時間変化の影響を調べた場合、分配比は1日までは増加し4日以降は低下することが判明した(図4)。以上より、修飾反応の条件としては、25乃至40°Cにおいて1乃至2日が好適であると判断した。図2との比較より、この条件にて調製されたPEG-SHzリポソームの親水性は、PEG2000-DSPEを総脂質量に対して3乃至5mol%程度含むリポソームの親水性に相当する。

**【0066】試験例2. ポリエチレングリコール修飾ステアリン酸ヒドラジドリポソームの保存安定性の検討**  
実施例2で製造したPEG-SHzリポソームを脂質濃度50mMで4°Cにて保存した場合の分配比の経時変化を調べた結果、該分配比は徐々に低下するものの25日間の保存後においてもPEG2000-DSPE 4mol%程度の修飾度に相当する親水性を維持することがわかった(図5)。

**【0067】試験例3. ポリエチレングリコール修飾ステアリン酸ヒドラジドリポソームの分散安定性の評価**  
多重層SHzリポソームの分散液に対し、50nmのエクストルージョンを行った。実施例2と同様にPEG-ALDを加

え、25乃至40°Cで20乃至30時間振とうした。さらに、再度50nmのエクストルージョンを行い、25乃至40°Cで20乃至30時間振とうしPEG-ALD修飾リポソームを得た。

**【0068】**こうして得られたPEG-SHzリポソームの分散液10μLに対し、1mLのリン酸緩衝生理食塩液(20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>および135mM塩化ナトリウムからなり、1N NaOHでpH7.4に調整したもの。以下、「PBS」という。)を加えた場合の体積平均粒子径を、粒子径測定機(Nicomp Submicron Particle Sizer Model 370、Nicomp Particle Sizing Systems社)を用いて測定した。

**【0069】**その結果を表2に示す。この結果は、いずれのPEG-ALDで修飾した場合でも安定に分散したリポソームが得られたことを示している。

**【0070】**

**【表2】**ポリエチレングリコール修飾ステアリン酸ヒドラジドリポソームのPBS中での粒子径。

**【0071】**

修飾剤	体積平均粒径* (nm)
PEG5000-CHO	96.3±38.1
PEG3400-(CHO) <sub>2</sub>	92.5±32.0

\* 平均±標準偏差

**試験例4. 37°C、PBS中におけるポリエチレングリコール修飾ステアリン酸ヒドラジドリポソームのポリエチレングリコール修飾度の経時変化の評価**

1μmのエクストルージョンを行ったPEG-SHzリポソームの37°C、PBS中での親水性変化を以下のように調べた。実施例2記載のPEG-SHzリポソームの分散液10mLを37°Cに加温したPBS1mLに加え、そのまま37°Cで振とうした。所定時間振とう後、ただちに25°Cに冷却し、6.7%のPEG6000と6.7%のデキストランT-500とを含む150mM塩化ナトリウム水溶液3mLを加え、試験例1と同様にして分配比を調べた。保温時間と分配比との関係を図6に示す。保温開始から分配比が経時に低下し、6時間以降0.2乃至0.3前後の値となることが判明した。この分配比から推測されるリポソームの親水性は、PEG2000-DSPEによる修飾度1mol%未満に相当する値であった。

**【0072】**PEG2000-DSPEによる修飾度が0乃至3mol%の領域においては、修飾リポソームの血中滞留性は修飾度の増加とともに上昇する(Maruyamaら、*Biochim. Biophys. Acta* 1128、44-49(1992)参照)。リポソームの血中滞留性は主として血漿タンパクや貪食細胞などの生体成分との相互作用によって決定される(D. D. Lasic、*Liposomes: from basic to applications*、pp. 265-321(1993)参照)ことから、PEG2000-DSPEによる修飾度が0乃至3mol%の領域においてリポソームと生体成分との相互作用が著しく変化すると推測される。従つ

て、上記において認められたPEG-SHzリポソームの親水性の経時変化量は、リポソームと生体成分との相互作用を変化させるのに十分であった。

**【0073】試験例4. 37°C、PBS中におけるポリエチレングリコール修飾ステアリン酸ヒドラジドリポソームの粒子径の経時変化の評価**

50nmのエクストルージョンを行ったPEG-SHzリポソームの37°C、PBS中での粒子径変化を次のように調べた。試験例3で調製方法を示したPEG-SHzリポソームの分散液10μLを37°CにしたPBS1mLに加え、そのまま37°Cで振とうした。所定時間振とう後、ただちに室温に冷却し、粒子径を測定した。その結果、平均粒子径は6時間後まで経時に減少しその後一定値となることがわかった(図7)。最終的な粒径の減少量は、20nm程度であり、分子量3400または5000の溶解性高分子のサイズの推定値(D. H. Napper、*Polymeric stabilization of colloidal dispersions* (Academic Press, 1983), p. 125参照)の2倍に近い値をとることがわかった。このことから、修飾剤が経時に離脱することが示唆された。

**【0074】比較例1. ポリエチレングリコールが安定に結合した修飾リポソーム、および無修飾リポソームの37°C、PBS中における経時変化の評価**

ポリエチレングリコールとリポソームが安定に結合した修飾リポソームとして試験例1記載のPEG2000-DSPEを5mol%含むリポソームを、また無修飾リポソームとして試

験例1記載のPEG2000-DSPEを含まないリポソームを製造し、これらのリポソームのPBS中37°Cにおける分配比の経時変化をPEG-SHzリポソームと同様に調べた。その結果、図8に示す通りPEG2000-DSPEリポソームでは高い分配比を24時間にわたって維持し、無修飾リポソームでは初期から低い分配比であり、いずれもその経時変化は著しく小さいことがわかった。

【0075】さらに、脂質組成をDPPC/ステアリルアミン(以下、SAとする。)/コレステロール=44/16/40(モル比)としてSHzリポソームと同様に調製したSAリポソームに対し、200mMのNa(CN)BH<sub>3</sub>を共存させることによりPEG5000-CHOを安定に共有結合させたPEG-SAリポソームについても同様の検討を行った。その結果はPEG2000-DSPEリポソームと同様であり、分配比の経時変化は著しく小さいことがわかった(図8)。

【0076】PEG-SHzリポソームにおける経時的な分配比の低下はリポソームのポリエチレングリコール修飾量の減少に対応している。さらに、そのリポソーム表面からのポリエチレングリコールの離脱は可逆的なシップ塩基の切断によるものであり、修飾反応の結果生じたPEG-ALDとSHzの複合体がリポソーム膜から遊離したためではないことが示された。

【0077】比較例2. 37°C、PBS中における各種リポソームの粒径の経時変化の評価  
分配比評価時と同様に比較用のリポソームを調製し50nmのエクストルージョンを行った。これらのリポソームの37°C、PBS中における粒径をPEG-SHzリポソームと同様に調べたところ、いずれのリポソームについても平均粒子径の経時変化は著しく小さいことがわかった(図9)。

【0078】以上のことから、PEG-SHzリポソームにお

いて認められた粒子径の経時的な減少は、リポソーム表面の離脱の結果生じたものであると考えられた。

#### 【0079】

【発明の効果】本発明により、水溶性高分子からなる修飾剤が経時的に離脱するリポソームが得られた。本発明のリポソームは、環境の相違に依存せず、経時的に性質が変化することより、機能性微粒子としての汎用性が広い。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】全脂質に対するPEG2000-DSPEの構成比とリポソームへの導入率との関係図。

【図2】全脂質に対するPEG2000-DSPEの構成比とリポソームの分配比との関係図。

【図3】SHzリポソームのPEG-ALD修飾時の反応温度と分配比との関係図。

【図4】SHzリポソームのPEG-ALD修飾時の反応時間と分配比との関係図。

【図5】PEG5000-SHzリポソームを4°Cで保存した場合の分配比の経時変化図。

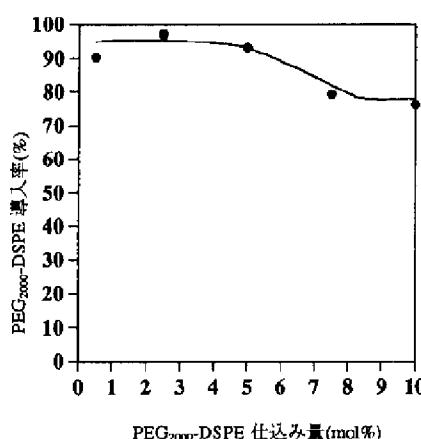
【図6】37°C、PBS中における、PEG-SHzリポソームの分配比の経時変化図。

【図7】37°C、PBS中における、PEG-SHzリポソームの粒子径の経時変化図。

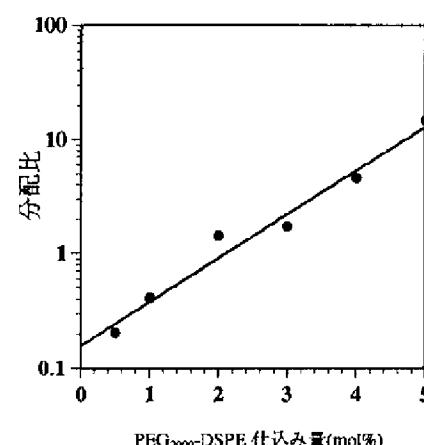
【図8】37°C、PBS中における、PEG2000-DSPEを5mol%含むリポソーム、含まないリポソーム、およびPEG5000-CHOを不可逆修飾したSAリポソームの分配比の経時変化図。

【図9】37°C、PBS中における、PEG2000-DSPEを5mol%含むリポソーム、含まないリポソーム、およびPEG5000-CHOを不可逆修飾したSAリポソームの粒子径の経時変化図。

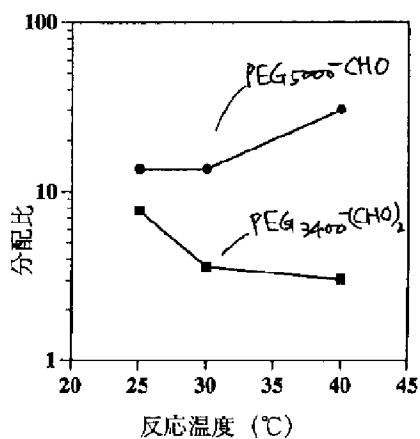
【図1】



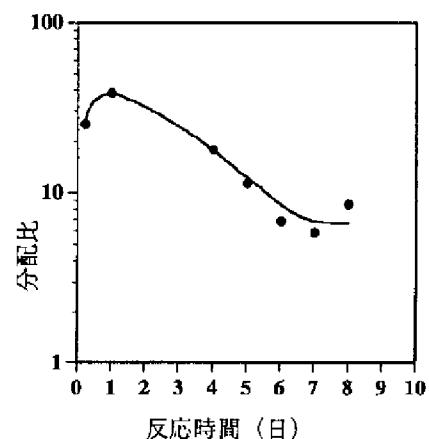
【図2】



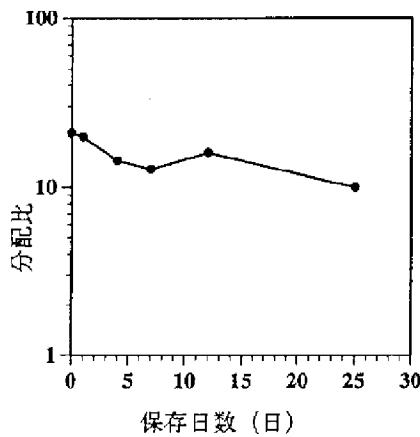
【図3】



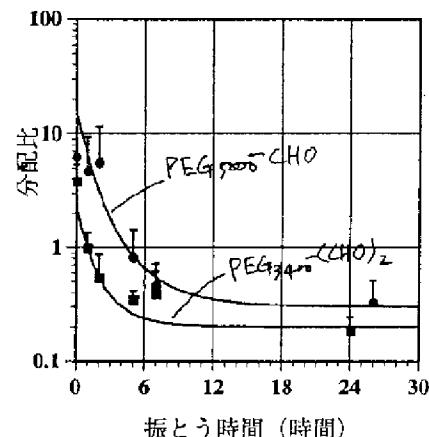
【図4】



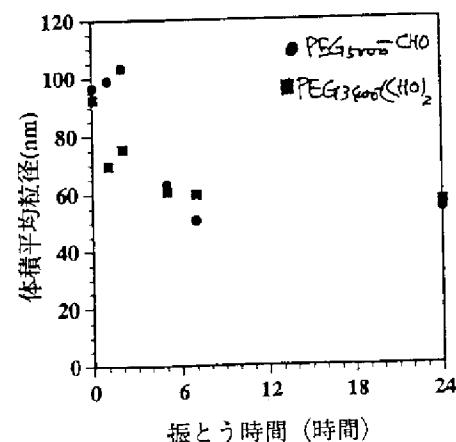
【図5】



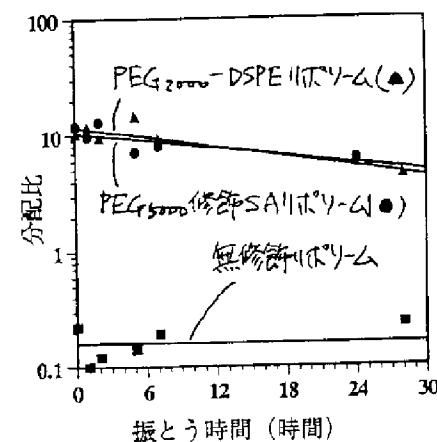
【図6】



【図7】



【図8】



【図9】

